中华按蚊 α-羧酸酯酶 AsAe7 的异源表达、纯化与结晶

张甜甜，苗 娅，许柏英*，陈 斌*

（重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所，媒介昆虫重庆市重点实验室，重庆 401331）

摘要：【目的】羧酸酯酶(carboxylesterase, COE)是昆虫体内一类重要的解毒酶,与昆虫的抗药性相关。本研究旨在对中华按蚊 *Anopheles sinensis* 羧酸酯酶 Ae7(Asae7)进行初步晶体学研究,为解析 AsAe7 的空间结构及探讨其分子功能奠定基础。【方法】首先对 *Asae*7 进行生物信息学分析,然后进行分子克隆,并利用原核表达系统在体外对 *Asae*7 进行重组表达;结合 Ni-NTA 金属螯合层析和葡聚糖凝胶层析方法纯化融合表达蛋白;通过葡聚糖凝胶层析和化学交联结果分析 AsAe7 的聚合状态;采用坐滴气相扩散法对 AsAe7 进行结晶筛选。【结果】生物信息学分析表明,AsAe7 是亲水性蛋白,分子量为 61.053 kD,无跨膜区和信号肽;3D 结构预测结果分析显示,AsAe7 采取的是 α/β-水解酶超家族折叠模式。多序列比对结果表明,在不同昆虫中 Ae7 蛋白具有高度保守性。分子克隆得到中华按蚊 AsAe7 的编码基因 *Asae*7 序列,大小为 1 626 bp。成功构建重组质粒 pET28a-*Asae*7;在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中表达的融合蛋白 AsAe7 主要分布在上清中。通过镍柱亲和层析和凝胶过滤层析纯化出了高纯度且稳定的目的蛋白;通过凝胶过滤层析和化学交联获得纯化的 AsAe7 主要呈单体状态;同时通过晶体筛选获得了 AsAe7 的晶体。【结论】运用结晶学的方法初步获得了 AsAe7 的晶体,为后续解析 AsAe7 的晶体结构以及在原子分辨率水平上直观阐释 AsAe7 参与代谢抗性的分子机制奠定了基础。

关键词：中华按蚊；羧酸酯酶；代谢抗性；异源表达；AsAe7 结晶

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2018)01-0048-11

Heterologous expression, purification and crystallization of α-carboxylesterase AsAe7 from *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae)

ZHANG Tian-Tian, MIAO Ya, XU Bo-Ying*, CHEN Bin* (Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract:【Aim】Carboxylesterase is one kind of the important detoxifying enzymes in insects, and is associated with insecticide resistance. The aim of this study is to explore the structure and the function of the carboxylesterase Ae7 from *Anopheles sinensis* (AsAe7) based on its preliminary crystallography.【Methods】The *Asae*7 gene was bioinformatically analyzed, cloned, and expressed in prokaryotic expression system. The recombinant protein was purified with nickel chelate affinity chromatography and gel filtration chromatography. The polymerization of AsAe7 was detected by gel filtration chromatography and chemical crosslinking analysis, and the crystal screening was performed by sitting drop vapor

基金项目：重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2015jcyjBX0142, cstc2016jcyjA0375)；重庆市教委科学技术研究项目(KJ1500326)；重庆师范大学博士启动项目(15XLB009)；"两江学者"计划专项经费；国家自然科学基金项目(31672363, 31372265)；国际原子能机构 CRP 项目(18268)；国家科技基础性工作专项重点项目(2015FY210300)

作者简介：张甜甜，女，1990 年 11 月生，甘肃陇西人，硕士研究生，研究方向为昆虫分子生物学，E-mail：1455459639@qq.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail：xbywh@126.com；c_bin@hotmail.com

收稿日期 Received：2017-06-03；接受日期 Accepted：2017-07-04

diffusion technique. 【Results】Bioinformatic analysis revealed that AsAe7 is a hydrophilic protein of 61.053 kD without transmembrane regions and signal peptide. The 3D structural prediction showed that AsAe7 adopts an α/β-hydrolase superfamily fold. Multiple sequence alignment result demonstrated that Ae7 proteins are highly conserved in different insects. The 1 626 bp coding sequence of *Asae7* was cloned, and the recombinant plasmid pET28a-*Asae7* was constructed correctly. The SDS-PAGE analysis illustrated that the fusion protein AsAe7 expressed in *Escherichia coli* mainly existed in the supernatant. The highly purified and stable protein was then obtained with two-step affinity chromatography. Gel filtration chromatography and chemical crosslinking analysis showed that AsAe7 mainly exists as monomer *in vitro*. Finally, protein crystals of AsAe7 were obtained by crystal screening. 【Conclusion】Crystals of the recombinant AsAe7 have been obtained by crystallography, which lays the foundation for illustrating the crystal structure of AsAe7 and the molecular mechanisms of AsAe7-mediated metabolic resistance at atomic resolution.

Key words: *Anopheles sinensis*; carboxylesterase; metabolic resistance; heterologous expression; AsAe7 crystallization

蚊媒传染病,即蚊媒病,是以蚊虫为传播媒介的自然疫源性疾病。例如疟疾就是由疟原虫引起的蚊媒病,主要通过雌性按蚊叮咬传播,于夏秋季发病较多,至今仍然是危害人类最严重的疾病之一(Rivero *et al*., 2010; Nkya *et al*., 2013; David *et al*., 2013)。为了控制蚊媒病的传播,降低蚊媒病的疫情,目前最主要的途径就是对传播媒介的控制。长期以来,化学防治是媒介蚊虫控制广泛使用的一种措施。然而,由于大量使用化学杀虫剂,越来越多的蚊虫对杀虫剂已产生了抗药性,而且抗性地区也在不断扩大,抗性增长速率在迅速提高(刘起勇, 2006),这就使得蚊虫防治变得非常困难。因此抗药性已成为当前蚊媒防控的主要研究课题。

迄今,已有研究结果表明昆虫抗药性机制主要包括靶标位点突变(如 *kdr*)对杀虫剂不敏感和解毒酶基因过量表达代谢杀虫剂等(Heckel, 2012)。而昆虫对杀虫剂的代谢抗性主要涉及 3 大类解毒酶:细胞色素 P450 氧化酶(cytochrome P450, P450)、羧酸酯酶(carboxylesterase, COE)和谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)(Weill *et al*., 2003; Ffrench-Constant *et al*., 2004; Hemingway *et al*., 2004; Bass and Field, 2011; Perry *et al*., 2011; Heckel, 2012)。其中 P450 被普遍认为是蚊虫体内对杀虫剂进行代谢作用最主要的解毒酶系,因此被研究得最多最深入。然而,随着对哺乳动物羧酸酯酶代谢作用的研究,人们逐渐认识到羧酸酯酶在某些无脊椎动物中也是负责杀虫剂代谢的主要酶系(Ross *et al*., 2006; Ai *et al*., 2010)。据相关报道,在抗性昆虫中,羧酸酯酶直接提高对杀虫剂酶促水解效率(Newcomb *et al*., 1997b)的抗性分子机制有两种:(1)羧酸酯酶基因扩增导致表达水平提高(Claude *et al*., 1987)。(2)羧酸酯酶编码序列突变引起结构改变,导致酶促作用增强(Campbell *et al*., 1998; Claudianos *et al*., 1999)。

酯酶基因扩增导致抗性产生的机制,主要在半翅目昆虫(如桃蚜 *Myzus persicae*、稻褐飞虱 *Nilaparvata lugens*)以及双翅目昆虫(如致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*)中被报道过。最早是在桃蚜中发现,其抗性和敏感品系中总酯酶活性存在明显差异,但抗性品系酯酶氨基酸序列未发生取代突变,而酯酶基因产生高拷贝数(Devonshire and Sawicki, 1979; Devonshire and Moores, 1982)。另外,从来自加利福尼亚的一个致倦库蚊 *Cx. quinquefasciatus* 有机磷抗性品系和来自法国的一个尖音库蚊 *Cx. pipiens* 有机磷抗性品系中分离到 2 个酯酶 EstB1 和 EstA1(Gullemaud *et al*., 1997),发现抗性品系中这两个酯酶的含量分别是敏感品系的 500 和 70 倍,并检测到抗性品系的基因组文库中 EstB1 的拷贝数至少是敏感品系中的 250 倍(Mouches *et al*., 1987)。随后从来自中国南部致倦库蚊有机磷抗性品系中也分离到一个酯酶新基因 *ESTB*8,发现 *ESTA*8(estß)也存在扩增机制(Qiao and Raymond, 1995; Qiao *et al*., 1998)。在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中,通过 RT-PCR 分析得到 *CCEae3a* 在抗性品系中也是通过基因扩增进行上调表达(Poupardin *et al*., 2014)。

酯酶基因突变导致的抗性最早是在家蝇 *Musca domestica* 及铜绿蝇 *Lucilia cuprina* 对有机磷的抗性研究中发现的,在 6 个有机磷抗性家蝇品系中均有

一个突变酯酶 $E3^{G137D}$，可以缓慢地将有机磷杀虫剂类似物酶促转化成代谢产物（Oppenoorth and Van Asperen, 1960; Sabourault *et al.*, 2001）。此后，对铜绿蝇有机磷抗性和敏感的品系研究结果也发现了同样的结果。在铜绿蝇有机磷敏感品系（LS2）中分离和克隆的一个 E3 酯酶基因 *LcaE7*（Newcomb *et al.*, 1997a），发现在二嗪磷抗性品系（L103）中此基因发生了突变 *LcaE7*（G137D）才导致了抗性的产生（Newcomb *et al.*, 1997a）。紧接着从铜绿蝇的另外 2 个对二嗪磷敏感却对马拉硫磷抗性的品系中又分离出一个不同于二嗪磷抗性的 E3 突变酯酶基因（$LcaE7^{W251L}$），相对敏感品系 LS2 增强了对马拉硫磷的酶促转化效率（Campbell *et al.*, 1998）。在尖音库蚊 *Cx. pipiens* 中也证明羧酸酯酶 B1 的突变体 *W224L* 与有机磷杀虫剂的抗性有关（Cui *et al.*, 2007）。

总之，昆虫羧酸酯酶介导的代谢抗性研究目前虽然是集中在基因扩增和基因突变等抗药性机理，但其关注点却是羧酸酯酶在昆虫抗药性的进化上发挥的作用（Ranson *et al.*, 2002），并没有真正从分子水平的角度去全面剖析羧酸酯酶与杀虫剂的相互作用，以及羧酸酯酶基因突变和序列多样性对抗性的影响。

中华按蚊 *Anopheles sinensis* 是传播疟疾和马来丝虫病等蚊媒病的重要媒介之一。本研究以中华按蚊为研究对象，基于前期测序获得的中华按蚊基因组和转录组数据，以及中华按蚊羧酸酯酶基因在不同地区野外抗性与感性的表达谱数据，初步筛选出可能在中华按蚊杀虫剂抗性中起重要作用的羧酸酯酶基因 *Asae7*。通过对其进行生物信息学分析、分子克隆、表达、纯化和初步的晶体初筛，旨在获得 AsAe7 的晶体，为后续解析 AsAe7 的晶体结构，在原子分辨率水平上直观分析 AsAe7 与底物杀虫剂的互作以及序列突变导致的影响，揭示羧酸酯酶参与代谢抗性的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

中华按蚊来自重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所实验室品系，饲养条件为温度 18～25℃，相对湿度为 50%～70%，光周期为 12L∶12D。

1.2 主要试剂

反转录试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒均为北京康为试剂生物公司产品。限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ，DNA Marker，T4 连接酶均为 TaKaRa 公司产品；镍离子亲和层析柱（Ni-NTA）和分子筛 HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR 购自 GE Healthcare 公司；其余试剂均为国产分析纯。结晶试剂盒购于 Hampton Research 公司。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 和 BL21(DE3)感受态细胞及 pET28a 表达载体为本实验室自备保存。

1.3 中华按蚊 *Asae7* 基因序列及其特征分析

中华按蚊 *Asae7* 基因序列是基于本实验室所测中华按蚊基因组数据分析而得。利用 ExPASy 网站中 ProtParam（http://web.expasy.org/protparam/）对 AsAe7 蛋白的分子量、吸光值、等电点等理化性质进行预测；AsAe7 蛋白的跨膜区、信号肽、疏水性分别利用 SignalP4.1 软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）、TMHMM 软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）、ProtScale 软件（http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl）进行预测；蛋白质的二级结构预测使用软件 PSIPRED v3.3（http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/）；蛋白质的三级结构采用 SWISS-MODEL（http://swissmodel.expasy.org/）进行同源建模及 3D 结构预测；使用 NCBI 网站中的 Protein BLAST 软件（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome）查找与 AsAe7 同源性较高，并已报道过与抗性相关的 9 个物种的序列，采用在线比对工具 Multalin（http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/）及 ESPript 3.0（http://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi）完成多序列比对分析。

对 *Asae7* 基因序列进行分析后，利用 Primer Premier5.0 软件设计引物：5′-CCG<u>GAATTC</u>ATGAGCTCCACGGACCATC-3′（划线部分为 *Eco*R Ⅰ 酶切位点），5′-CCG<u>CTCGAG</u>TTAATAAAGTTCCTCTCGACTG-3′（划线部分为 *Xho* Ⅰ 酶切位点）。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 *Asae7* 基因的分子克隆及重组质粒的构建

用 Trizol 法提取中华按蚊足部总 RNA。以提取的总 RNA 为模板参照 Thermo Scientific 公司 First Strand cDNA Synthesis Kit 进行反转录得到 cDNA。再以 cDNA 为模板，PCR 扩增 *Asae7*。PCR 扩增的反应体系为 25 μL：Fast Pfu DNA Polymerase 0.5 μL，5×Buffer 5 μL，2.5 μmol/L dNTP 2 μL，模板 1 μL，10 μmol/L 引物各 0.5 μL，ddH_2O 15.5 μL。PCR

反应条件：94℃ 5 min；94℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 90 s，30 个循环；最后 72℃最终延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

将目的基因 *Asae*7 与原核表达载体 pET-28a 同时经过 *Eco*RⅠ和 *Xho*Ⅰ双酶切，纯化后在 T4 连接酶的作用下 4℃过夜连接，将连接产物转入感受态细胞大肠杆菌 DH5α 中。挑取单菌落进行菌液 PCR 鉴定，并提取质粒进行双酶切验证，将初步鉴定正确的阳性克隆送去测序验证。

1.5 AsAe7 蛋白的重组表达和纯化

将构建成功的重组质粒 pET28a-*Asae*7 转化到感受态细胞大肠杆菌 BL21(DE3)中，在 37℃ 200 r/min 条件下进行震荡培养。培养至 OD_{600}达到 0.6 ~ 0.8 时，加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 分别在 37℃和 16℃下进行诱导表达，其中 37℃诱导表达 4 h，16℃诱导表达 20 h。诱导表达完成后，4 000 × g 离心 10 min 收集菌体，然后用裂解液(20 mmol/L Tris-HCl，200 mmol/L NaCl，pH 8.0)裂解细胞，经超声波处理(功率 400 W，超声 2 s，间歇 3 s，工作 10 min)和高速离心(12 000 r/min 30 min)后，分别收集上清和沉淀中的包涵体，SDS-PAGE 分析 *Asae*7 在上清和包涵体中的表达情况。最后根据表达结果，确定蛋白的表达条件。

依据摸索出的蛋白表达条件，对 AsAe7 蛋白进行过量表达后收菌，每 500 mL 菌体加入 30 mL 预冷的重悬菌体缓冲液(即结合缓冲液：20 mmol/L Tris-HCl，200 mmol/L NaCl，pH 8.0)重悬菌体，混匀后冰浴超声破碎细胞(功率 400 W，超声 1 s，间歇 3 s，工作时间 30 min)，结束后 4℃ 12 000 r/min 高速离心 30 min，取蛋白上清加入到已用结合缓冲液平衡好的镍柱中进行流穿。然后用适量含咪唑浓度梯度(0，20 和 40 mmol/L 咪唑)的结合缓冲液冲洗杂蛋白，最终用 6 mL 含有 500 mmol/L 咪唑的结合缓冲液进行目的蛋白的洗脱。最后 SDS-PAGE 检测镍柱纯化结果。

将含有 500 mmol/L 咪唑的结合缓冲液洗脱的 AsAe7 蛋白进行 HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤层析精细纯化，所用缓冲液为 20 mmol/L HEPES，200 mmol/L NaCl，pH 7.0。分步收集蛋白样品。根据蛋白大小和出峰位置比对，收取目的蛋白进行 SDS-PAGE 检测。

1.6 化学交联法测定蛋白聚合状态

化学交联是将相互作用的蛋白质通过化学试剂共价连接，从而形成稳定的蛋白-蛋白相互作用，不同的交联剂有着不同的臂长、反应基团以及其他的一些化学性质。本实验采用的交联剂为甲醛(formaldehyde)，其臂长为 2.3 ~ 2.7 Å，参与反应的蛋白质基团主要为氨基，亚氨基及酰氨基，羟基和 –SH 等。

对于甲醛交联反应，取 0.5 mg/mL 20 μL AsAe7 用等体积的含有 2% 甲醛的 PBS 混匀之后，于 25℃孵育 10，30，60 和 120 min。其中，空白对照为 AsAe7 与不加甲醛的 PBS 于 25℃孵育。完成后加 20 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0 终止反应。交联反应的样品加入 SDS-PAGE 上样缓冲液后直接进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.7 AsAe7 蛋白的结晶

利用超滤管(截流大小 30 kD)将分子筛纯化后的 AsAe7 蛋白浓缩至 12 mg/mL，使用 Hampton Research 公司的结晶试剂盒 Index™-HR2-144，Crystal Screen™-HR2-110 和 Crystal Screen 2™-HR2-112，在 16℃恒温条件下采用坐滴气相扩散法进行晶体初筛，即在 96 孔坐滴结晶板中加入 100 μL 结晶下槽液，上样孔中加入 1 μL AsAe7 蛋白，再加入 1 μL 相对应的下槽液进行覆盖，密封后于 16℃静置培养。

2 结果

2.1 AsAe7 的生物信息学分析

2.1.1 基本理化性质分析：利用 ProtParam 软件预测得到 AsAe7 蛋白的分子量为 61.053 kD，等电点为 5.70，吸光值为 1.453。其中 AsAe7 的不稳定系数为 28.24，则该蛋白稳定(表 1)。在氨基酸组成中，甘氨酸(Gly)所占比例最高，为 9.6%。

2.1.2 信号肽和跨膜区预测：对 AsAe7 蛋白运用 SingalP 软件进行信号肽分析，结果表明此蛋白的 C 值为 0.115，Y 值为 0.104，S 值为 0.113，不存在信号肽切割位点，即 AsAe7 蛋白无信号肽。同时对 AsAe7 蛋白运用 TMHMM2.0 软件进行跨膜结构域分析，结果表明该蛋白无跨膜区。

2.1.3 疏水区分析：对 AsAe7 蛋白运用在线 ProScale 软件进行疏水区分析，结果表明在中华按蚊 AsAe7 蛋白的 N 端第 127 – 144 位氨基酸之间有一个典型的疏水区域。猜测这段疏水区域可能与底物有机杀虫剂结合相关。

2.1.4 二级结构预测：对 AsAe7 蛋白运用PSIPRED v3.3软件进行二级结构分析，结果表明 AsAe7 蛋白二级结构中无规卷曲、β 折叠和 α-螺旋分别占 55.08%，

表 1 中华按蚊 AsAe7 蛋白的理化性质

Table 1 Physiochemical properties of AsAe7

理化性质 Physicochemical property	预测结果 Predicted outcomes
分子式 Formula	$C_{2738}H_{4184}N_{732}O_{810}S_{23}$
分子质量 Molecular weight (kD)	61.053
平均亲水系数 Grand average of hydropathicity	-0.392
吸光度 Abs	1.453
等电点 pI	5.7
负电荷残基 Asp + Glu 数 Number of the negatively charged residues Asp and Glu	65
正电荷残基 Arg + Lys 数 Number of the positively charged residues Arg and Lys	56
不稳定系数 Instability index	28.24
脂肪系数 Aliphatic index	75.43

22.74% 和 20.52%，可见 AsAe7 蛋白的二级结构中主要是无规卷曲为主。

2.2 AsAe7 与其他 9 种昆虫的同源性序列比对及其三级结构的预测

迄今已有不少科学家对昆虫的羧酸酯酶进行了研究，发现家蝇 *M. domestica*，致倦库蚊 *C. quinquefasciatus*，棉蚜 *Aphis gossypii*，桃蚜 *M. persicae* 以及褐飞虱 *N. lugens* 等对有机磷杀虫剂均具有抗性（Devonshire，1977；Mouches *et al.*，1990；Vaughan and Hemingway，1995；Vaughan and Hawakes，1997；高希武等，1998；Karunaratne *et al.*，1999；Li *et al.*，2007）。并且研究还表明，在昆虫中对有机磷杀虫剂的抗药性与羧酸酯酶有较大的关联，抗药性越强羧酸酯酶的活力越高（Villani *et al.*，1983；Wirth *et al.*，1990；Sreerama and Veerabhadrappa，1991；Whyard *et al.*，1994，1995）。

将中华按蚊的 AsAe7 与家蝇、库蚊等 9 种昆虫同源性较高的序列进行多重序列比对并建立同源序列比对图（图 1），结果发现它们的保守性较高，并具有相同的催化三联体（Ser192，Glu325 和 His446），同时结合杀虫剂的关键残基（Gly109，Gly110，Gly111 和 Glu191 等）也相对保守。据此我们推测 AsAe7 确实与抗性相关。

通过在 RCSB PDB 网站中（http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do）输入 AsAe7 的氨基酸序列进行搜索，发现铜绿蝇的一个 α-羧酸酯酶 LcαE7（PDB：4FG5）与 AsAe7 的同源性最高，氨基酸序列一致性是 213/543（39%）。选取 LcαE7 的结构作为同源建模的模板，通过 SWISS-MODEL 同源建模，预测得到 AsAe7 蛋白质的三级结构（图 2）。

从结构图可以看出 AsAe7 采取的是 α/β-水解酶超家族折叠模式，具备 α/β-水解酶折叠模式的典型核心区域及 Ser-His-Glu 催化三联体。除了 8 个典型的 β 链（1-8），AsAe7 结构中间的 β 片还包含起始的两条反向平行 β 链和末端的两条反平行 β 链。同时 AsAe7 也存在 6 个典型的 α 螺旋（a-f）（图 2：A）。比较 AsAe7 和 LcαE7 的结构可以发现 AsAe7 的底物结合口袋主要是由 β1 后一个短的反平行 β 片及两个 α 螺旋束组成。其中 AsAe7 在 a-d 螺旋后也有一个短的螺旋，它可以通过分开 2 束 α 螺旋而进一步打开底物结合口袋（图 2：B）。所以，AsAe7 底物口袋中的活性残基也更加开放，推测更易结合底物有机磷等杀虫剂而介导代谢抗性。

2.3 AsAe7 融合蛋白的表达检测及纯化

基因 *Asae7* 的 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析，在 1 000 ~ 2 000 bp 之间获得特异性条带，大小与预期结果（1 626 bp）一致。重组质粒 pET28a-*Asae7* 构建完成后，将质粒经 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 酶切验证，结果显示可以切出 1 600 bp 左右的基因片段，初步表明质粒构建成功。后续进行测序，结果进一步证实重组质粒构建成功。

将 AsAe7 融合组氨酸标签的重组表达质粒 pET28a-*Asae7* 转化至 BL21（DE3）后，在 0.2 mmol/L IPTG 37℃ 和 16℃ 下分别诱导 4 h 和 20 h，收集诱导后的菌体经超声破碎后，SDS-PAGE 结果表明，重组的 His_6-Asae7（62.0 kD）在 16℃ 上清中有大量表达（图 3：A），其在 37℃ 下主要表达为包涵体，所以最终确定的过量表达条件为 16℃ 下诱导表达。

收集大量表达的 AsAe7 蛋白后，采用镍柱亲和层析（Ni-NTA）和分子筛层析（SEC）相结合的方法对在上清液中大量表达的 AsAe7 蛋白进行纯化。镍柱亲和层析纯化后，电泳结果显示高浓度咪唑洗脱下的目的蛋白在大概 62 kD 左右处产生单一条带（图 3：B）。

将高浓度咪唑洗脱下的目的蛋白 AsAe7 直接上样分子筛，纯化后的分子筛层析图谱显示，AsAe7 在峰尖 58.68 mL 处出了一个单一对称的主峰（图 4：A），结合电泳结果表明经过镍柱和分子筛纯化后的 AsAe7 条带单一，纯度高，状态稳定（图 4：B）。同时，从蛋白质的出峰位置，对照分子筛层析柱柱性能图谱，可推测出纯化后的 AsAe7 蛋白为单体。

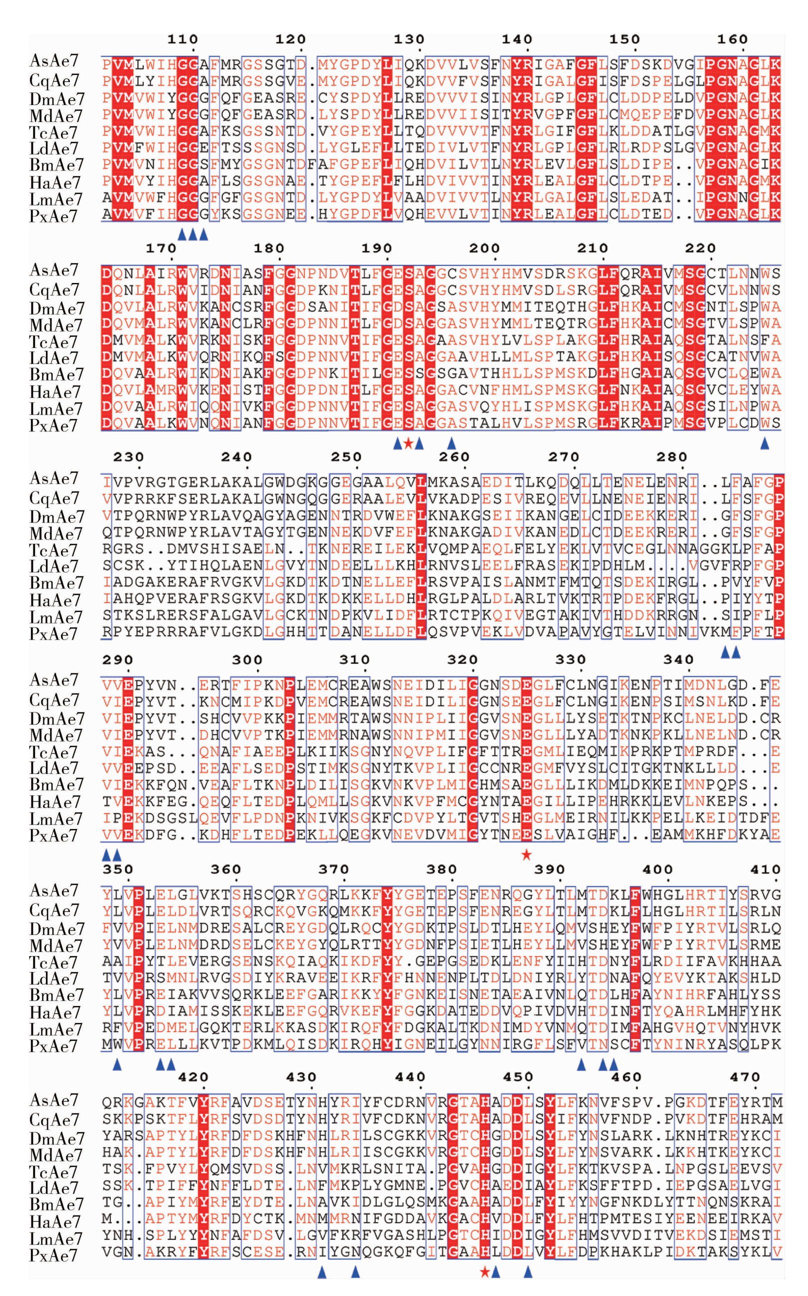


图 1　中华按蚊 AsAe7 与其他昆虫同源蛋白的序列比对

Fig. 1　Multiple sequence alignment of AsAe7 and homologous proteins from other insects

多序列比对采用 Multalin（http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html）和 ESPript 3.0（http://espript.ibcp.fr/ESPrint/cgibin/ESPript.cgi）。其他昆虫的蛋白质序列均下载自 NCBI 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov）。The multiple sequence alignment was performed using programs MultAlin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html) and ESPript 3.0 (http://espript.ibcp.fr/ESPript/cgibin/ESPript.cgi). All sequences from other insects were downloaded from the NCBI database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Ae7 序列来源及 GenBank 登录号分别为 Origin of Ae7 proteins and their GenBank accession numbers: CqAe7：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*（ABO85014.1）；DmAe7：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（NP_524258.2）；MdAe7：家蝇 *Musca domestica*（XP_005178696.1）；TcAe7：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（KYB26709.1）；LdAe7：马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*（AIY68378.1）；BmAe7：家蚕 *Bombyx mori*（XP_012546670.1）；HaAe7：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（ADF43483.1）；LmAe7：蝗虫 *Locusta migratoria*（AHJ81320.1）；PxAe7：小菜蛾 *Plutella xylostella*（XP_011550238.1）. 星号表示催化三联体；三角形表示结合底物的关键残基；高度保守的氨基酸残基显示为红色。The catalytic triad is denoted by asterisks, the key residues binding with substrates are marked with triangles, and the highly conserved residues are colored in red.

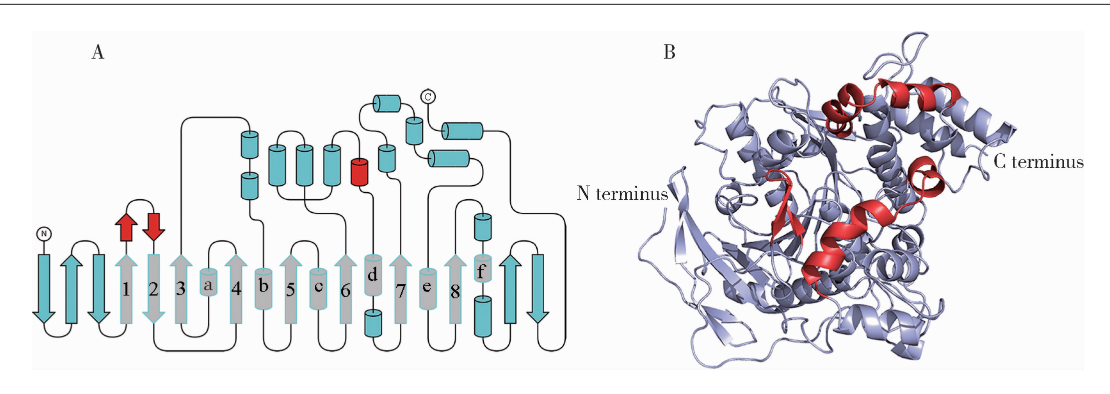


图 2　预测的 AsAe7 三级结构的拓扑图(A)和飘带图(B)

Fig. 2　The predicted topological structure (A) and ribbon diagram (B) of AsAe7

拓扑图(A)中灰色区域表示 α/β-水解酶折叠模式的典型核心区域,a – f 表示 α 螺旋,1 – 8 表示 β 链;飘带图(B)中红色结构区域及红色和蓝色方框圈出的 α 螺旋束组成的是底物结合口袋区。The canonical α/β-hydrolase fold of AsAe7 is highlighted in gray. The letters a – f represent α-helices, and the numerals 1 – 8 represent β-sheets in the topological structure diagram (A). The structure areas in red and the bundles of α-helices boxed in red and blue comprise the substrate cavity in the ribbon diagram (B).

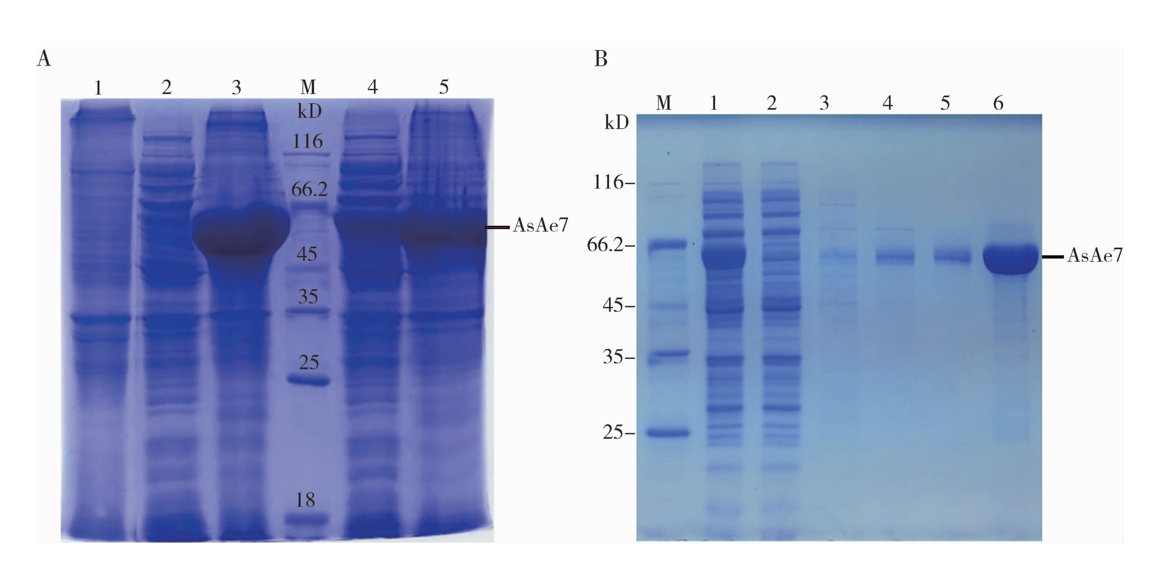


图 3　AsAe7 重组蛋白的诱导表达(A)和镍柱纯化(B)

Fig. 3　Induced expression (A) and Ni-NTA purification (B) of the recombinant protein AsAe7

A: 1: 诱导前 BL21(DE3)本底蛋白对照 The background protein of *Escherichia coli* BL21(DE3) before induction; 2: 37℃诱导后总蛋白经超声裂解后的上清 Supernatant of the total protein with ultrasonic cracking after induction at 37℃; 3: 37℃诱导后总蛋白经超声裂解后的沉淀 Precipitate of the total protein with ultrasonic cracking after induction at 37℃; M: 蛋白标准分子量 Protein molecular weight marker; 4: 16℃诱导后总蛋白经超声裂解后的上清 Supernatant of the total protein with ultrasonic cracking after induction at 16℃; 5: 16℃诱导后总蛋白经超声裂解后的沉淀 Precipitate of the total protein with ultrasonic cracking after induction at 16℃. B: M: 蛋白标准分子量 Protein molecular weight marker; 1: 破碎后的蛋白上清 Supernatant after ultrasonic cracking; 2: 蛋白上清过柱后的流穿液 Flow-through solution of the supernatant after column binding; 3: 结合缓冲液过柱后的洗脱液 Eluent of the binding buffer after column binding; 4 – 6: 分别含 20, 40 和 500 mmol/L 咪唑的结合缓冲液过柱后的洗脱液 Eluent of the binding buffer containing 20, 40 and 500 mmol/L imidazole after column binding, respectively.

2.5　AsAe7 的化学交联结果

取 0.5 mg/mL 的 AsAe7 蛋白与 2% 甲醛(formaldehyde, FA)在 25℃下进行化学交联,交联时间依次为 10, 30, 60 和 120 min,电泳结果表明纯化后的 AsAe7 在溶液中主要是以单体的形式存在,进一步验证了分子筛层析的出峰结果(图 5)。

2.6　AsAe7 蛋白的晶体初筛

将高纯度的 AsAe7 蛋白浓缩至约 12 mg/mL,在 Index™ HR2-144, Crystal Screen™-HR2-110 和 Crystal Screen 2™-HR2-112 共 3 个结晶试剂盒的 192 个条件下进行晶体的筛选。其中在 Index™ 的 66 号条件(25% w/v PEG3350, 0.2 mol/L $(NH_4)_2SO_4$,

A

Manual run 6:10 UV1 280 nm
Manual run 6:10 Fractions
58.68
紫外吸收值(mAU) UV absorbance
500
450
400
350
300
0
20
40
60
体积 Volume (mL)

B
kD
M　40　41　42　43　44　45　46　47　48
116
66.2
45
35
25

图 4　AsAe7 分子筛层析图(A)和分子筛层析后的 SDS-PAGE 图(B)

Fig. 4　Profile of size exclusion chromatography (SEC) (A) and SDS-PAGE analysis after SEC (B) of AsAe7

A：分子筛图谱上有一个明显的主峰，峰尖位置为 58.68 mL There was only one distinct peak in the chromatography with peak position at 58.68 mL.
B：M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；40 – 48：分别为第 40 ~ 48 管蛋白样品 The corresponding no. 40 – 48 fractions.

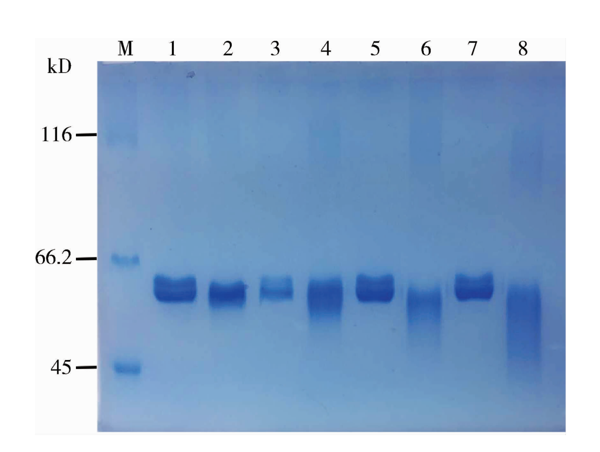
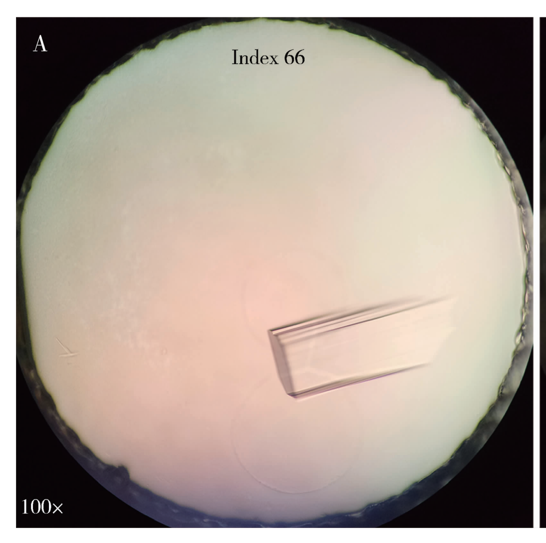


图 5　AsAe7 化学交联结果

Fig. 5　The chemical crosslinking result of AsAe7

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1，3，5，7：对照，AsAe7 在不含甲醛的 PBS 溶液中于 25℃下分别孵育 10，30，60 和 120 min AsAe7 was incubated in PBS solution without formaldehyde at 25℃ for 10，30，60 and 120 min，respectively and used as the control；2，4，6，8：AsAe7 用含 2% 甲醛的 PBS 溶液 25℃分别交联 10，30，60 和 120 min AsAe7 was incubated with PBS solution containing 2% formaldehyde at 25℃ for 10，30，60 and 120 min，respectively.

0.1 mol/L Bris-Tris, pH 5.5)(图 6:A)和 67 号条件(25% w/v PEG3350, 0.2 mol/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 mol/L HEPES, pH 7.5)下出现的晶体较大(图 6:B)。重复这两个条件,同时用无蛋白的缓冲液作对照,结果只有蛋白结晶。尝试将 66 号条件下的晶体挑出送至上海光源衍射,分辨率能达到 8 Å。后续还需尝试各种条件提高晶体的衍射质量以收集数据解析晶体结构。



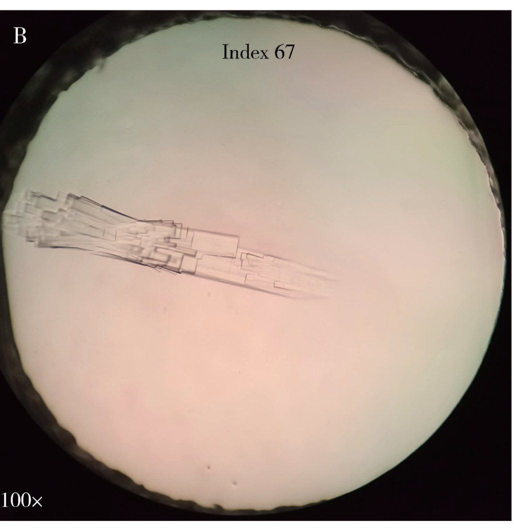


图 6 AsAe7 的晶体

Fig. 6 Crystals of AsAe7

A:在 Index™的 66 号条件(25% w/v PEG3350, 0.2 mol/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 mol/L Bris-Tris, pH 5.5)下长出的 AsAe7 蛋白晶体 Crystals of AsAe7 grown in the condition of Index™-66 (25% w/v PEG3350, 0.2 mol/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 mol/L Bris-Tris 5.5);B:在 Index™的 67 号条件(25% w/v PEG3350, 0.2 mol/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 mol/L HEPS, pH 7.5)长出的 AsAe7 蛋白晶体 Crystals of AsAe7 grown in the condition of Index™-67 (25% w/v PEG3350, 0.2 mol/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 mol/L HEPS, pH 7.5).

3 讨论

羧酸酯酶是昆虫体内一类重要的解毒酶,本研究通过对中华按蚊羧酸酯酶 AsAe7 进行分子克隆、表达、纯化和结晶,获得了生长状态较好的晶体。虽然目前晶体的衍射质量还不理想,但后续可以通过尝试对目的蛋白的浓度、pH 值、结晶条件中沉淀剂的浓度、盐浓度和缓冲液的 pH、种类等多个条件进行优化来提高衍射分辨率。截至目前,在 PDB 库中尚未报道有中华按蚊羧酸酯酶的结构被解析。

在昆虫中羧酸酯酶一直被认为在脂质和异源物质代谢中起重要的生理作用(Campbell *et al*., 2003; Birner-Gruenberger *et al*., 2012),但过去 50 多年的研究主要是关注在羧酸酯酶对杀虫剂抗性的进化上发挥的作用(Ranson *et al*., 2002)。如在其他昆虫包括蚊虫中的研究大多都集中在对关键羧酸酯酶的基因鉴定、系统发育分析以及基因克隆等方面,并没有真正从分子水平的角度去全面剖析羧酸酯酶与杀虫剂的相互作用,以及羧酸酯酶基因突变和序列多样性对抗性的影响。

然而,在昆虫羧酸酯酶三维结构未知的情况下,酶与杀虫剂或天然底物的相互作用以及基因突变和序列多态性对抗性的影响等,这些在分子水平上是无法理解的。在本研究中,通过对中华按蚊羧酸酯酶 AsAe7 进行生物信息学分析、分子克隆,首次在大肠杆菌表达体系中表达出有活性的中华按蚊羧酸酯酶,并纯化获得高纯度的 AsAe7,最后结晶顺利获得了生长状态较好的晶体。本工作为今后得到高分辨率的晶体并解析 AsAe7 的三维结构打下了基础。

基于 AsAe7 的空间结构,从结构生物学的角度出发可直观清晰地阐释其水解代谢蚊虫杀虫剂的分子机制。鉴于本研究已成功获得得单一的野生型的 AsAe7 晶体,后续可以尝试将 AsAe7 与拟除虫菊酯或有机磷等杀虫剂进行共结晶,得到含有杀虫剂底物的复合物晶体更能彻底地从原子分辨率水平分析其代谢机理,并且基于分子结构识别天然底物,有望研制出更有效的杀虫剂进行蚊虫防控。总之,本研究为后续 AsAe7 晶体结构的解析奠定了基础,也为进一步深入探讨 AsAe7 介导中华按蚊代谢抗性的

分子机制提供了基于结构生物学的新思路。

参考文献（References）

Ai GM, Zou DY, Shi XY, Li FG, Liang P, Song DL, Gao XW, 2010. HPLC assay for characterizing r-cyano-3-phenoxybenzyl pyrethroids hydrolytic metabolism by *Helicoverpa armigera* (Hübner) based on the quantitative analysis of 3-phenoxybenzoic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 694 – 701.

Bass C, Field LM, 2011. Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Manag. Sci.*, 67: 886 – 890.

Birner-Gruenberger R, Bickmeyer I, Lange J, Hehlert P, Hermetter A, Kollroser M, Rechberger GN, Kühnlein RP, 2012. Functional fat body proteomics and gene targeting reveal *in vivo* functions of *Drosophila melanogaster α-Esterase-7*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 42(3): 220 – 229.

Campbell PM, de Q Robin GC, Court LN, Dorrian SJ, Russell RJ, Oakeshott JG, 2003. Developmental expression and gene/enzyme identifications in the alpha esterase gene cluster of *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.*, 12(5): 459 – 471.

Campbell PM, Newcomb RD, Russell RJ, Oakeshott JG, 1998. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 28 (3): 139 – 150.

Claude M, Pasteur N, Berge JB, Hyren O, 1987. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science*, 233(4765): 778 – 780.

Claudianos C, Russell RJ, Oakeshott JG, 1999. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 29(8): 675 – 686.

Cui F, Hong H, Cong J, Liu XL, Qiao CL, 2007. Do mosquitoes acquire organophosphate resistance by functional changes in carboxylesterases? *FASEB J.*, 21(13): 3584 – 3591.

David JP, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJ, 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 368(1612): 20120429.

Devonshire AL, 1977. The properties of a carboxylesterase from the peach-potatoaphid, *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochem. J.*, 167(3): 675 – 683.

Devonshire AL, Moores GD, 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorous, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 18(2): 235 – 246.

Devonshire AL, Sawicki RM, 1979. Insecticide resistant-*Myzus persicae* as an example of evolution by gene duplication. *Nature*, 280: 140 – 141.

Ffrench-Constant RH, Daborn PJ, Le Goff G, 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet.*, 20(3): 163 – 170.

Gao XW, Zhao Y, Wang X, Dong XL, Zheng BZ, 1998. Induction of carboxylesterase in *Helicoverpa armigera* by insectides and plant allelochemical. *Acta Entomol. Sin.*, 41(1): 5 – 11. [高希武, 赵颖, 王旭, 董向丽, 郑炳宗, 1998. 杀虫剂和植物次生性物质对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用. 昆虫学报, 41(1): 5 – 11]

Gullemaud T, Makate N, Raymond M, Hirst B, Callaghan A, 1997. Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. *Insect Mol. Biol.*, 6 (4): 319 – 327.

Healy MJ, Dumancic MM, Oakeshott JG, 1991. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, 29(7 – 8): 365 – 388.

Heckel DG, 2012. Insecticide resistance after silent spring. *Science*, 337 (6102): 1612 – 1614.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 34(7): 653 – 665.

Karunaratne SHPP, Small GJ, Hemingway J, 1999. Characterization of the elevated esterase-associated insectide resistance mechanism in *Nilaparvata lugens* (Stal) and other planthoppper species. *Int. J. Pest Manag.*, 45: 225 – 230.

Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 321 – 253.

Liu QY, 2006. Media biological comprehensive global policy framework. *Chin. J. Vector Biol. Control*, 17(2): 1 – 3. [刘起勇, 2006. 媒介生物综合治理全球策略. 中国媒介生物学及控制杂志, 17 (2): 1 – 3]

Mouches C, Magnin M, Berge JB, De Silvestri M, Beyssat V, Pasteur N, Georghiou GP, 1987. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(8): 2113 – 2116.

Mouches C, Pauplin Y, Agarwal M, Lemieux L, Herzog M, Abadon M, Beyssat-Arnaouty V, Hyrien O, de Saint Vincent BR, Georghiouii GP, Pasteur N, 1990. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insectide resistance in *Culex*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(7): 2574 – 2578.

Newcomb R, Campbell P, Russell R, Oakeshott J, 1997a. cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 27(1): 15 – 25.

Newcomb RD, Campbell PM, Ollis DL, Cheah E, Russell RJ, Oakeshott JG, 1997b. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorous hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (14): 7464 – 7468.

Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David JP, 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 43(4): 407 – 416.

Oppenoorth FJ, van Asperen K, 1960. Allelic genes in the housefly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance. *Science*, 132(3422): 298 – 299.

Perry T, Batterham P, Daborn PJ, 2011. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 41 (7): 411 – 422.

Poupardin R, Srisukontarat W, Yunta C, Ranson H, 2014. Identification of carboxylesterase genes implicated in temephos resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8(3): e2743.

Qiao CL, Marquine M, Pasteur N, Raymond M, 1998. A new esterase gene amplification involved in OP resistance in *Culex pipiens* mosquitoes from China. *Biochem. Genet.*, 36(11 – 12): 417 – 425.

Qiao CL, Raymond M, 1995. The same esterase B1 haplotype is amplified in insecticide-resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex from the Americas and China. *Heredity*, 74: 339 – 345.

Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R, 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 298(5591): 179 – 181.

Rivero A, Vézilier J, Weill M, Read AF, Gandon S, 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem. *PLoS Pathog.*, 6(8): e1001000.

Ross MK, Borazjani A, Edwards CC, Potter PM, 2006. Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochem. Pharmacol.*, 71(5): 657 – 669.

Sabourault C, Guzov VM, Koener JF, Claudianos C, Plapp FW, 2001. Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss-of-function in the chromosome 2 ali-esterase (*MdaE7*) gene in resistant house flies. *Insect Mol. Biol.*, 10(6): 609 – 618.

Sreerama L, Veerabhadrappa PS, 1991. Purification and properties of carboxylesterase from the mid-gut of the termite *Odontotermes horni*. W. *Insect Biochem.*, 21(8): 833 – 844.

Vaughan A, Hawakes N, 1997. Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase gene in insectide-resistance *Culex quinquefasciatus*. *Biol. J.*, 325(Pt2): 359 – 365.

Vaughan A, Hemingway J, 1995. Mosquito carboxylesterase Estα2[1] (A_2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J. Biol. Chem.*, 270(28): 17044 – 17049.

Villani F, White GB, Curtis CF, Miles SJ, 1983. Inheritance and activity of some esterase associate with organophosphate resistance in mosquitoes of the complex *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, 73: 153 – 166.

Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M, 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 423: 136 – 137.

Whyard S, Downe AE, Walker VK, 1994. Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 24(80): 819 – 827.

Whyard S, Downe AE, Walker VK, 1995. Characterization of a novel esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 29(4): 329 – 342.

Wirth MC, Marquine M, Georghiou GP, Pasteur N, 1990. Esterase A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): role in organophosphate resistance and linkage. *J. Med. Entomol.*, 27(2): 202 – 206.

(责任编辑：马丽萍)